

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-039283

(43)Date of publication of application : 19.02.1993

(51)Int.Cl.

C07D309/32
C12P 17/06
// A61K 31/35
A61K 31/35
(C12P 17/06
C12R 1:465)

(21)Application number : 05-098321

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 31.01.1991

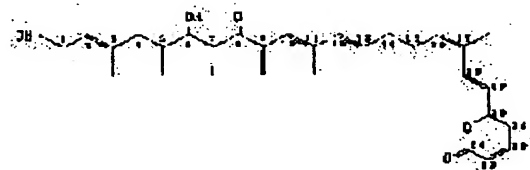
(72)Inventor : ABE KEIICHI
NAOKI HIDEO
AMANO NORIHIDE
AMACHI TERUO
YOSHIZUMI HAJIME
YOSHIDA MINORU
BEPPU TERUHIKO

(54) NEW SUBSTANCE, S-59917A, AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject new substance produced by microorganism and applicable as a carcinostatic agent.

CONSTITUTION: The objective new substance S-59917a expressed by formula is produced by a microbial strain belonging to the genus Streptomyces and has a structure similar to that of leptomycin B (a known antitumor substance) with the exceptions of the formation of a methylol group with the 1-carbon atom, the presence of methyl group at 17-site and the demethylation at the 21-site. Since the S-59917a has an activity to specifically and reversibly arrest the cell life cycle of a rat fibroblast cell 3Y1 at G1 phase and G2 phase, it is expected to be useful as a new type carcinostatic agent.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-39283

(43)公開日 平成5年(1993)2月19日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 309/32		6701-4C		
C 1 2 P 17/06		2104-4B		
// A 6 1 K 31/35	ADU	7252-4C		
	ADZ	7252-4C		
(C 1 2 P 17/06				

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-98321

(22)出願日 平成3年(1991)1月31日

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 阿部 圭一

神奈川県川崎市中原区宮内561A-304

(72)発明者 直木 秀夫

大阪府堺市浜寺昭和町4-554

(72)発明者 天野 典英

大阪府高槻市北園町7-17

(72)発明者 天知 輝夫

兵庫県宝塚市雲雀丘山手2-1-10

(74)代理人 弁理士 青木 朗 (外4名)

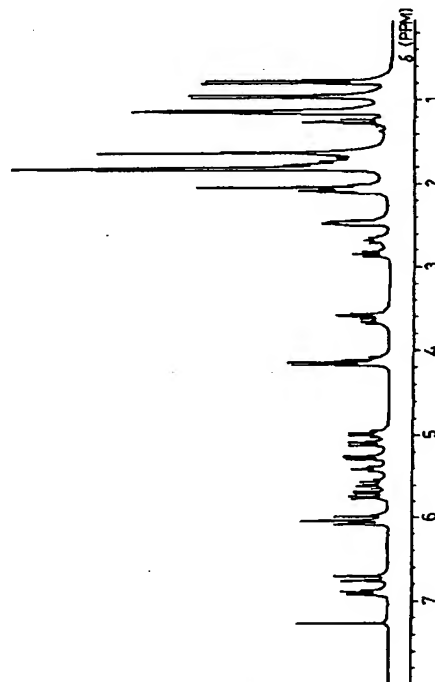
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規物質S-59917a及びその製造方法

(57)【要約】

【目的】微生物が生産し、抗癌剤として適用可能な新規物質を提供する。

【構成】ストレプトマイセス属に属する微生物が生産する既知抗腫瘍性物質レプトマイシンBと構造上近似するが、構造式上、その1位の炭素原子がメチロール基を形成し、17位にメチル基を有し、そして21位デメチル体である点で相違する新規物質S-59917a及びその製造方法を提供する。このS-59917aは、ラット繊維芽細胞3Y1にたいして、細胞周期をG1, G2期に特異的かつ可逆的に停止させる活性を有するので新たなタイプの抗癌剤としての用途が期待できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下に記載の物理化学的性質を有する新規物質S-59917a:

- A. 分子量が498 (S I マススペクトルでの測定) であり、
 B. 紫外線吸収スペクトル (メタノール溶液での測定) が λ_{max} 243 及び 296 nm を示し、
 C. 赤外線吸収スペクトル (フィルムでの測定) が約 1707 及び 1732 cm^{-1} 並びに 3450 cm^{-1} に特徴のある吸収を示し、
 D. 1H -NMR スペクトルが 4.14 ppm に特徴のある吸収を示し、
 E. ^{13}C -NMR スペクトルが 59.2 ppm に特徴のある吸収を示し、
 F. 比旋光度が -130 度 ($c=0.18$, メタノール) であり、
 G. 薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム/メタノール=9/1, 薄層: メルク社製「HPTLC シリカゲル 60 F₂₅₄ 使用」) の R_f 値が約 0.7 であり、
 H. 呈色反応がヨード反応及びバニリン硫酸反応に陽性で、ニンヒドリン反応に陰性であり、
 I. 溶解性がメタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル及びクロロホルムに可溶性で、水及びヘキサンに不溶性であり、そして
 J. 物質の外観が淡黄色油状である。

【請求項2】 ストレプトマイセス属に属する請求項1*

*記載の抗癌物質S-59917a生産菌を栄養培地に培養し、培養液中に該物質を生成蓄積させ、該培養物から該物質を採取することを特徴とする新規物質S-59917aの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

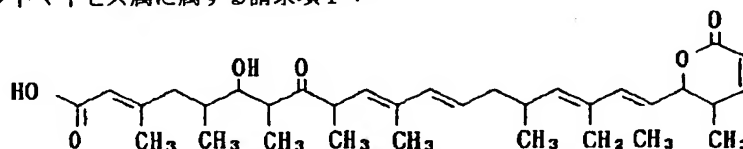
【産業上の利用分野】 本発明は、新規物質S-59917a及びその製造方法に関し、より具体的には、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属に属する放線菌が生産し、抗腫瘍作用及び抗真菌作用を有する新規物質に関する。

【0002】

【従来の技術】 詳細には後述する物理化学的性質の本新規物質S-59917aの類縁物質としては、いずれもストレプトマイセス属に属する放線菌が生産するレプトマイシン (*Leptomycin*) B [ザ・ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス (*The Journal of Antibiotics*), 36巻、639~650ページ、1983、及び特開昭61-109717号公報参照]、レプトマイシンA (特開昭62-65692号公報参照)、カズサマイシンB (特開昭62-277378号公報参照) 及び新規物質KR2827 (特開昭63-203676号公報参照) が知られている。例えば、レプトマイシンBについては、次式

【0003】

【化1】



【0004】で示される構造式が提案されており、特に、マウスに移植したP388細胞、ルイス・ラング・カルチノーマ細胞、B16メラノーマ細胞及びエーリッヒ・カルチノーマ細胞などに強い抗腫瘍作用を示すことが知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 周知のようにガンには多様性があり、これまで開発されてきた抗癌剤はある種のガンには有効であるが、別のタイプのガンには無効である場合も多い。また、薬剤自体の物理化学的特性、例えば親水性又は疎水性、さらに特定の官能基の有無によってその生体内動態、器官親和性には微妙な差が存在することも既知である。従って、より有効なガン化学療法に資するには、さらに多様な抗癌物質を提供することが依然と望まれている。そこで、本発明の目的は、上記レプトマイシンに類縁する化合物であるが、その構造、特に官能基において特徴を有する新規物質を提供するこ

とにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的に沿い、そして従来の臨床的に使用されている抗癌剤はDNA合成阻害剤或いは該毒に分類されるものがほとんどであることに鑑みて、新しい抗腫瘍剤を開発すべくDNA合成阻害或いは該毒の作用を示さない新規な活性物質を広く土壌分離菌の培養液中から探索した。その結果、京都府の土壌サンプルから分離した放線菌の一菌株が、正常細胞を可逆的に細胞周期の制御期と考えられているG1、G2期に特異的に停止させ、さらに従来の文献に未載である物質を生産することを見出し本発明を完成した。

【0007】 従って、本発明によれば以下に記載の物質化学的性質を有する新規物質S-59917aが提供される。

A. 分子量が498 (S I マススペクトルでの測定) で

あり、

B. 紫外線吸収スペクトル（メタノール溶液での測定）が λ_{\max} 243及び296 nmを示し（図1参照）、

C. 赤外線吸収スペクトル（フィルムでの測定）が約1707及び1732 cm^{-1} 並びに3450 cm^{-1} に特徴のある吸収を示し（図2参照）、

D. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルが4.14 ppmに特徴のある吸収を示し（図3参照）、

E. $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルが59.2 ppmに特徴のある吸収を示し（図4参照）、

F. 比旋光度が-130度（ $c=0.18$ 、メタノール）であり、

G. 薄層クロマトグラフィー（展開溶媒：クロロホルム／メタノール＝9／1、薄層：メルク社製「HPTLCシリカゲル60F254使用」の R_f 値が約0.7であり、

H. 呈色反応がヨード反応及びバニリン硫酸反応に陽性で、ニンヒドリン反応に陰性であり、

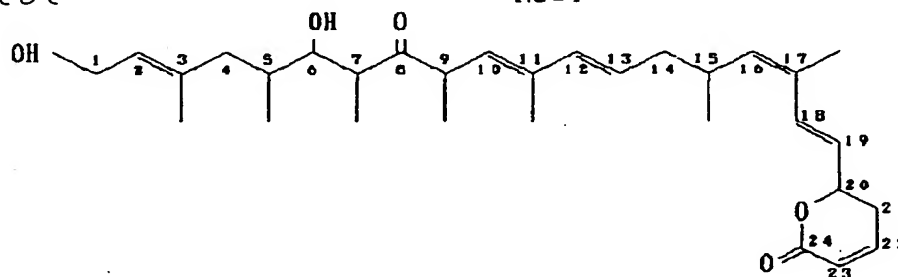
I. 溶解性がメタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル及びクロロホルムに可溶性で、水及びヘキサンに

* J. 物質の外観が淡黄色油状である。

【0008】上記の物理化学性質、特に各スペクトルから明らかなように、本発明の新規物質は上記レプトマイシンBに構造上近似するものの、赤外線吸収スペクトルの約1707及び1732 cm^{-1} の波形よりカルボン酸に由来するカルボニル基の吸収の不存在、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及び $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルのそれぞれ4.14 ppm及び59.2 ppmの吸収にみられるように水酸基の結合したメチレン（ $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ）に由来するプロトン及び炭素の存在が示唆され、レプトマイシンBを初めとする上記従来文献に記載のレプトマイシンA、カズサマイシンB及び新規物質KR2827が1位の炭素原子がカルボキシル基に由来することに比し極立つ構造上の特徴を有する。すなわち、各スペクトル解析の結果、本発明の新規物質S-59917aは、平面構造式上レプトマイシンBの21位デメチル体で、17位のエチル基がメチル基に、そしてかつ末端（1位炭素）カルボン酸がアルコールに置き代わった下記式で示される構造を有するものと推定できる。

【0009】

【化2】



【0010】新規物質S-59917aは、ラット繊維芽細胞3Y1にたいして、細胞周期をG1、G2期に特異的かつ可逆的に停止させる活性を有し、これまで、臨床的に用いられている抗腫瘍剤とはまったく活性モードが異なることを示唆している。また、1 ng/mlという低濃度でも細胞増殖を停止させる強力な活性を有していることが判明した。従って、新規物質S-59917aは、新しいタイプの活性を有する抗腫瘍剤となり得ることが期待できる。

【0011】上記新規物質S-59917aは、もう一つの本発明である、ストレプトマイセス属に属する新規物質S-59917a生産菌を栄養培地に培養し、培養液中に該物質を生成蓄積させ、次いで該培養物から該物質を採取することを特徴とする新規物質S-59917aの製造方法によって有利に製造することができる。培養に用いる栄養培地としては、通常、放線菌の培養に用いられる培地ならばいずれも使用できる。また、液体培養のみならず、寒天などの固相をもちいた固体培養でも生産は可能である。

【0012】培養温度は、20～37℃が適当で、特に

25～30℃が好ましい。新規物質S-59917aは、主として菌体内に蓄積するが、培養液中にも生産されるので菌体抽出物、培養ろ液の両画分より精製できる。遠心分離或いはけいそう土等の適当なる過助材を用いたろ過により分離した菌体を、アセトン、アルコール、酢酸エチル等で抽出し、減圧濃縮して有機溶媒を除去したのち、以降の精製操作に処する。

【0013】また、培養ろ液からは、一般に脂溶性物質を抽出する非親水性有機溶媒、たとえば酢酸エチル、酢酸ブチル、クロロホルム等で抽出することで目的物質を有機溶媒層に転溶させ減圧濃縮する方法、或いは、吸着剤である活性炭、ダイアイオン（商標、三菱化成）HP20を用いて培養液中の目的物質を吸着させた後、前述の溶媒抽出操作に処することで粗標品を得ることができる。

【0014】得られた粗標品をさらに精製するには、一般に用いられる脂溶性物質の精製法をもちいることができる。すなわち、溶解度、二層溶媒にたいする分配率の差を利用した分離法、さらに、ゲルろ過、分配、吸着等の種々の分離モードを利用したカラムクロマトグラフィ

5

一を適宜組み合わせ用いて精製することが有効である。
例えば、上述のように得られた新規物質S-59917a粗標品をシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィー、セファデックス（商標、ファルマシア）LH20などを用いたゲルろ過法、セミ分取用シリカゲル、逆相シリカゲル等による高速液体クロマトグラフィーを用いることにより、新規物質S-59917aの精製が可能である。

【0015】本発明の新規物質S-59917aの生産菌は、上述のごとく京都府の畑の土壌より分離した放線菌10 菌であって、本発明者らがSAM1595株と命名する菌株を特に好ましいものとして挙げることができる。この菌株は、以下に示すような菌学的性質を有する。

【0016】1. 形態

SAM 1595株の培養性状

寒天培地名	気菌糸の着生状態	気菌糸の色調	コロニー裏面の色調	可溶性色素
シュクロース・硝酸塩	うっすら	灰		なし
グルコース・アスパラギン	かすか	灰	黄	なし
グリセリン・アスパラギン	なし	—		なし
スターチ・無機塩	やや豊富	灰	灰黄	なし
チロシン	やや豊富	灰		なし
栄養	なし	—	淡黄	なし
イースト・麦芽	うっすら	灰		なし
オートミール	うっすら	灰		なし

【0018】3. 生理的性質

生育温度範囲：18℃～35℃、生育至適温度は26℃～35℃

ゼラチンの液化：

グルコース・ペプトンゼラチン培地 陽性

単純ゼラチン培地 陽性

スターチの分解： 陽性

脱脂牛乳の凝固： 陰性

脱脂牛乳のペプトン化： 陰性

メラニン様色素の生成：

チロシン寒天培地 陰性

ペプトン・イースト鉄寒天培地 陰性

硝酸塩の還元： 陰性

【0019】炭素源の同化性：

1/10酵母エキス・スターチ寒天培地で28℃、3～5日間培養し、光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡で観察を行った。基生菌糸は分裂を伴って曲線状ないし直線状に伸長する。基生菌糸に断裂は認められない。基生菌糸より生じた気菌糸の先端に10～20個の胞子の連鎖が形成される。胞子連鎖は螺旋状である。胞子は楕円形、長さ1.2～1.6μm、幅0.6～0.9μm、胞子表面は毛状（hairy）である。胞子のう、運動性胞子、輪生岐（whorl）、菌核は認められない。

【0017】2. 培養性状

各種培地で28℃、21日間培養後観察を行った。観察結果を表1に示す。

【表1】

炭素源	同化性
L-アラビノース	-
D-キシロース	-
D-グルコース	+
D-フラクトース	±
シュクロース	-
イノシトール	±
L-ラムノース	±
ラフィノース	+
D-マンニトール	-

+: 利用する、 ±: 利用は疑わしい

-: 利用しない

【0020】4. 化学分類学的性質

細胞壁組成: 全菌体中にL-ジアミノピメリン酸を含む。

キノン組成: MK-9 (H4) とMK-9 (H6) を主成分として持つ。

なお、各種試験は「放線菌の同定実験法」(清野 昭雄編、日本放線菌研究会、東京、1985年)に準拠して行った。

【0021】以上のようにSAM 1595株は基生菌系より、連鎖胞子を形成する気菌系を形成し、胞子のう、運動性胞子、輪生岐(whorl)、菌核を形成せず、またジアミノピメリン酸がLL型であること等の特徴を有することから、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)属に属する放線菌であると考えられる。そこで、SAM 1595株を*Streptomyces* sp. と同定した。なお、SAM 1595株は*Streptomyces* sp. SAM1595と命名され工業技術院微生物工業技術研究所に平成3年1月18日に微工研条寄第3227号(FERM BP-3227)として寄託されている。

【0022】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明する。

実施例1 SAM 1595株の培養

100mlのYN培地を500ml坂口フラスコに分注し、滅菌後、SAM1595株をスラントより接種し、28℃、5日間振とう培養したもの9本をシードとし、

50L容ジャーファーマンターを用い25L滅菌YN培地で300rpm, 0.8vvmで28℃, 60時間通気攪はん培養し、さらにこれをシードとし、500L容ジョーファーマンターを用い270L滅菌YN培地で150rpm, 0.5vvm, 28℃で96時間、通気攪はん培養した。消泡剤にはアデカノールを使用した。

【0023】

YN培地(1L中の培地組成、pH7.0)

可溶性澱粉	20g
グリセロール	10g
ポリペプトン	5g
麦芽エキス	2g
乾燥酵母エキス	5g
塩化ナトリウム	2g

K₂HPO₄ 0.5g

HgSO₄・7H₂O 0.5g

【0024】実施例2 培養物からのS-59917aの抽出

上記の条件で培養後、培養液約300Lをろ過助剤を用いてろ過集菌し、集めた菌体をメタノール30L中で攪拌し、さらに酢酸エチル36Lを加え活性成分を抽出した。抽出液を2Lに減圧濃縮し溶媒を完全に除いたのち、ヘキサン2Lで洗浄後、酢酸エチル2Lで3回抽出後、抽出物を減圧濃縮し、S-59917aを含む茶褐色の油状物約150gを得た。

【0025】実施例3 S-59917aの精製

得られた抽出物を少量のクロロホルムに溶かし、数回に分けてクロロホルムで充填されたシリカゲルカラムでクロロホルム、メタノールによるグラジエント溶出クロマトグラフィーを行った。得られた活性画分を濃縮乾固後、セミ分取高速液体クロマトグラフィー(センシユー科学、アクアシルカラム、20×250mm)に付し、クロロホルム/メタノール(98:2)、さらにヘキサン/酢酸エチル(1:3)で繰り返し分取することでS-59917aの純品280mgを得た。

【0026】実施例4 S-59917aのラット繊維芽細胞3Y1に対する活性

ラット正常繊維芽細胞3Y1を、径35mmのシャーレに5×10⁴細胞接種した。培地は、12%血清を含むMEM培地2mlを用いた。各シャーレに、各種濃度のS-59917aを添加し、24時間後の細胞増殖に対する影響を、フローサイトメトリーを用いて以下に示す方法で解析した。すなわち、常法に従がい、薬剤処理後の細胞をトリプシン処理により集め、界面活性剤Nonident(商標、シグマケミカル)P40処理により、裸核を得、これを、プロビジウムイオダイドで核染色したものをサンプルとし、Epics(商標、コールター社)Cを用いて、488nm励起光で、核一つあたりのDNA含量を測定することにより、細胞増殖の解析を行なった。その結果、S-59917aは1ng/m

9

1 濃度で上記細胞周期をG1, G2期に停止させた。

【0027】

【発明の効果】本発明によれば、抗腫瘍作用及び抗真菌作用を有する新規物質S-59917aが提供される。かかる物質は、特異な抗腫瘍活性を示すレプトマイシンBと、特に1位の炭素原子がカルボキシル基に代わりメチロール基を有し、17位のエチル基に代わりメチル基を有し、そして21位デメチル体である点で構造式上相違するので、生体内に投与した場合レプトマイシンBと異なる薬物動態を示すことが期待できる。

【図面の簡単な説明】

10

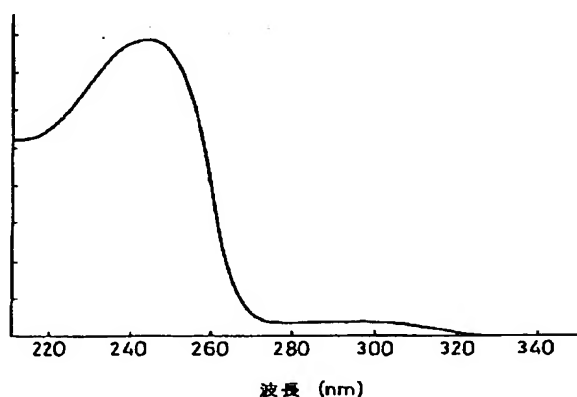
【図1】メタノール中で測定しS-59917aの紫外線吸収スペクトルを示す図である。

【図2】S-59917aをフィルム上にしてKBrセルを用いて測定した赤外線吸収スペクトルを示す図である。

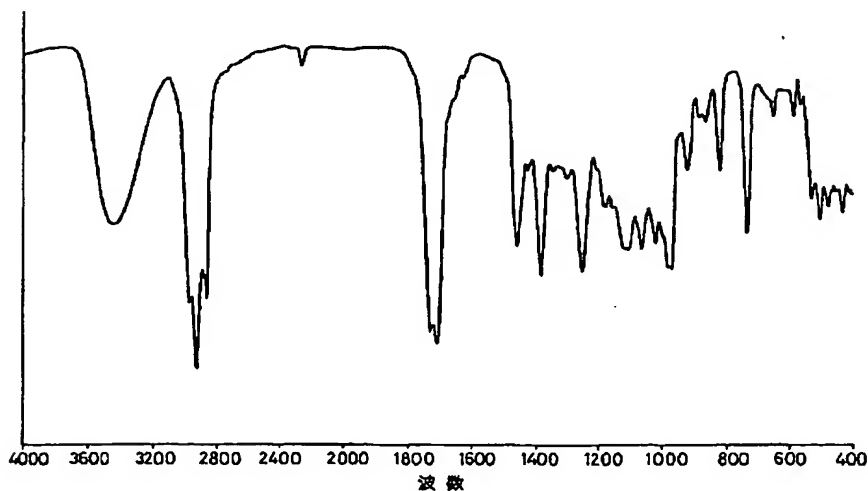
【図3】S-59917aの重クロロホルム中270MHzで測定した ^1H -NMRスペクトルを示す図である。

10 【図4】S-59917aの重クロロホルム中67.80MHzで測定した ^{13}C -NMRスペクトルを示す図である。

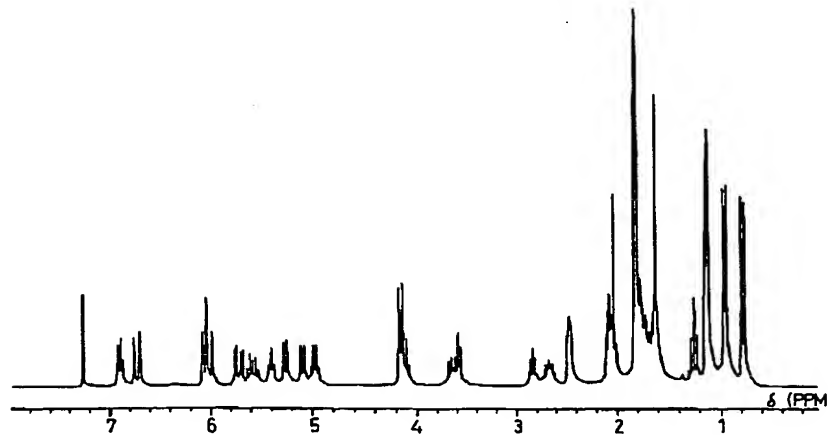
【図1】



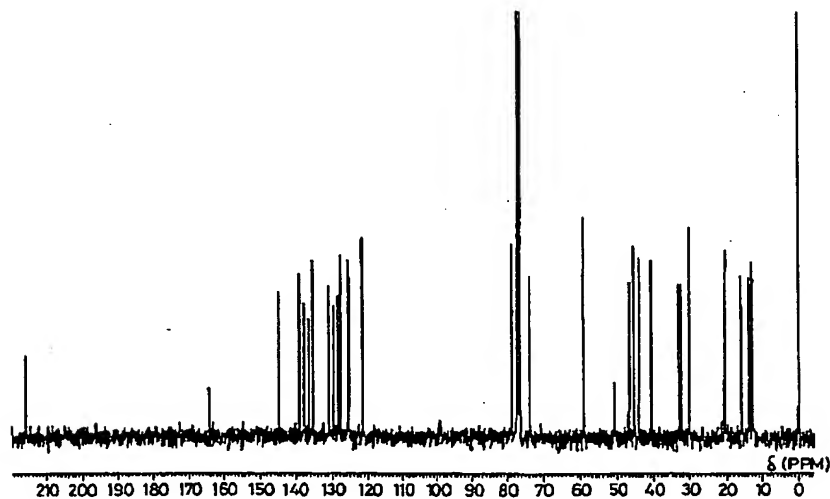
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵
C 1 2 R 1:465)

識別記号 庁内整理番号
7804-4B

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 吉栖 肇
東京都墨田区緑四丁目19-6-607

(72) 発明者 吉田 稔
埼玉県和光市白子3-18-1 リバーサイ
ド積田502
(72) 発明者 別府 輝彦
東京都杉並区堀之内1-5-21